

528, 235

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. April 2004 (22.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/033683 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: **C12N 15/10**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP2003/008825**

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. August 2003 (08.08.2003)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
02020904.5 18. September 2002 (18.09.2002) **EP**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **SIRS-LAB GMBH [DE/DE]**; Winzerlaer Strasse 2a,
07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SCHMIDT, Karl-Her-
mann [DE/DE]**; Waldstrasse 15, 07646 Stadtroda (DE).
STRAUBE, Eberhard [DE/DE]; Hermann-Löns-Strasse
58, 07745 Jena (DE). **RUSSWURM, Stefan [DE/DE]**; An
der Leutra 4, 07743 Jena (DE).

(74) Anwälte: **STÖRLE, Christian** usw.; Geyer, Fehners &
Partner, Perhamerstrasse 31, 80687 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **METHOD FOR ENRICHING A PROKARYOTIC DNA**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR ANREICHERUNG PROKARYONTISCHER DNA**

(57) Abstract: The invention concerns a method for enriching a prokaryotic DNA, whereby at least one prokaryotic DNA is con-
tacted with at least one protein or at least one polypeptide, the latter being capable of being bound with the non methylated CpG, the
DNA-protein/polypeptide complex being then separated. The invention also concerns a kit for implementing said method.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zur Anreicherung prokaryontischer DNA mit den Schritten Kontaktierung einer pro-
karyontischer DNA mit mindestens einem Protein oder Polypeptid, das fähig ist, an nicht-methylierte CpG-Motive zu binden, und
Separation des Protein/Polypeptid-DNA-Komplexes beschrieben. Darüber hinaus bezieht sich die Anmeldung auf einen Kit zur
Durchführung des Verfahrens.

WO 2004/033683 A1

Verfahren zur Anreicherung prokaryontischer DNA

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Anreicherung prokaryontischer DNA sowie einen Kit zur Durchführung des Verfahrens.

Durch Bakterien verursachte Infektionen sind eine der häufigsten Ursachen für Entzündungskrankheiten. Zur Prognose des Krankheitsverlaufes sowie insbesondere zur rechtzeitigen Auswahl geeigneter therapeutischer Maßnahmen ist der frühzeitige Nachweis der bakteriellen Erreger von entscheidender Bedeutung.

Zum Nachweis bakterieller Erreger werden vor allen Dingen verschiedene Methoden der Kultivierung von Zellen angewendet. In letzter Zeit haben aber auch molekularbiologische Methoden, die auf dem Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäuren basieren, an Bedeutung gewonnen. Neben der hohen Spezifität dieser Methoden ist der geringe Zeitbedarf als wesentlicher Vorteil gegenüber konventioneller Methoden zu nennen. Allerdings ist die Sensitivität des Nachweises prokaryontischer DNA direkt aus Körperflüssigkeiten und nicht vorbehandeltem Untersuchungsmaterial im Vergleich zur Kultur der Mikroorganismen bislang viel zu gering. Eine für den direkten Erregernachweis aus dem nicht vorbehandelten Untersuchungsmaterial ausreichende Menge an Nukleinsäuren von Bakterien wird allenfalls im Bereich der 16S-mRNA-Moleküle erreicht. Dies setzt aber voraus, daß sich die nachzuweisenden Bakterien in den metabolischen Phasen befinden und genügend 16S-mRNA exprimieren.

Davon ist insbesondere bei Patienten, die unter einer antibiotischen Therapie stehen, in der Regel nicht auszugehen. Darüber hinaus kommen bestimmte Pathogenitätsfaktoren von Bakterien nicht zu jeder Zeit zur Expression, obwohl die entsprechenden Gene im bakteriellen Genom vorhanden sind. Deshalb ist der Nachweis der Pathogenitätsfaktoren und Resistenzen von Bakterien auf chromosomaler Ebene für die Diagnose septischer Erkrankungen unabdingbar.

Dies umso mehr als auf dieser Ebene auch eine Unterscheidung zwischen pathogenen und kommensalen Bakterien getroffen werden kann.

Am häufigsten erfolgt der erregerspezifische Nukleinsäurenachweis durch Vervielfältigung der prokaryontischen DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bzw. der Ligase-Kettenreaktion (LCR). Der hohen Spezifität und schnellen Verfügbarkeit der Ergebnisse stehen die Störanfälligkeit durch Kontaminationen oder durch stark inhibierende Faktoren klinischer Proben gegenüber.

Bei einem herkömmlichen PCR-Nachweisverfahren ist für eine erfolgreiche Detektion von Erregern im Blut die Gesamt-DNA aus mindestens 1 bis 5 ml Blut zu isolieren. Die Gesamt-DNA-Konzentration ist dann aber zu groß, um direkt in einer PCR-Reaktion eingesetzt zu werden.

Anders verhält es sich mit der Blutkultur zum Nachweis von Erregern einer Sepsis. Dabei liegt die untere Nachweisgrenze bei weniger als 10 Bakterien pro ml. Diese Nachweisgrenze wird derzeit nur mit PCR-Protokollen erreicht, die ihre Zielsequenz im Bereich der 16S-RNA haben und damit von der Expression dieser Zielsequenz abhängig sind. Eine größere diagnostische Sicherheit ist von PCR-Protokollen zu erwarten, die ihre Zielsequenzen im Chromosom der Mikroorganismen haben. Gerade unter dem Einfluß einer laufenden Antibiotikatherapie kann das Expressionsverhalten verschiedener Gene erheblich verändert oder eingeschränkt sein, auch wenn das eingesetzte Antibiotikum letztlich nicht wirksam ist. Diese Situation ist gerade auf Intensivtherapiestationen häufig anzutreffen, auf denen die meisten Patienten unter Antibiotikatherapie stehen, bei denen aus diesem Grund keine relevanten Bakterien aus den Blutkulturen oder anderen Proben angezüchtet werden können.

Wegen unzureichender Sensitivität hat der erregerspezifische Nukleinsäurenachweis ohne Amplifikationsschritt durch direkten Nachweis der prokaryontischen DNA

(Sondentechnik, FISH-Technik) nur bei ausreichend hoher Keimzahl im Untersuchungsmaterial diagnostische Bedeutung.

Die wesentliche Problematik des Nachweises prokaryontischer DNA zur Identifikation bakterieller Erreger in Körperflüssigkeiten bestehen neben PCR-hemmenden Bestandteilen im Untersuchungsmaterial vor allem in dem Überschuss an eukaryontischer gegenüber prokaryontischen DNA. Hierbei sind insbesondere kompetitive Prozesse bei der DNA-Analyse sowie die geringe Menge an prokaryontischer DNA als hinderlich für einen qualitativen und quantitativen Erregernachweis anzusehen.

Die üblichen Methoden zur DNA-Isolierung reichern die Gesamt-DNA einer Körperflüssigkeit an, so daß das Verhältnis Wirts-DNA zu mikrobieller DNA zwischen $1 : 10^6$ und $1 : 10^8$ betragen kann. Aus diesem Unterschied ist die Schwierigkeit des Nachweises mikrobieller DNA in Körperflüssigkeiten gut nachzuvollziehen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, eine Methode bereitzustellen, die zur Isolierung und/oder Anreicherung mikrobieller DNA in Untersuchungsproben mit hohem Anteil eukaryontischer DNA von Patienten mit Infektionen für einen schnellen und einfachen Erregernachweis, der eine frühzeitige Diagnose von Infektionen, durch bakterielle Erreger verursacht, ermöglicht.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Anreicherung prokaryontischer DNA mit den Schritten

- a) Kontaktierung mindestens einer in Lösung befindlichen prokaryontischen DNA mit mindestens einem Protein oder Polypeptid, daß fähig ist, spezifisch an prokaryontische DNA zu binden, wodurch ein Protein oder Polypeptid-DNA-Komplex gebildet wird, und
- b) Separation des Komplexes.

Die Bezeichnung prokaryontische DNA bezieht sich dabei sowohl auf virale als auch auf bakterielle DNA. Diese kann aufgereinigt und wieder in Lösung gebracht sein oder direkt in der Ursprungsquelle (z. B. Körperflüssigkeit, wie Blut, Serum, etc.) vorliegen.

Die Separation kann mittels verschiedener Verfahren zur Isolierung oder Anreicherung von DNA-Protein-Komplexen oder DNA-Polypeptid-Komplexe erfolgen, die dem Fachmann hinlänglich bekannt sind. Dabei werden bevorzugt Methoden zur Anwendung

kommen, bei denen das DNA-bindende Protein an eine Trägermatrix immobilisiert ist, um die DNA aus der Probelösung anzureichern.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform schließt sich an die Separation ein Schritt zur Trennung von DNA und Protein/Polypeptid an. Dies kann beispielsweise durch herkömmliche Verfahren zur DNA-Aufreinigung erfolgen, die dem Fachmann bekannt sind. Im einfachsten Falle beruht die Auftrennung auf der Änderung des pH-Wertes oder der Salzkonzentration (z. B. auf 1 M NaCl) des Mediums/Puffers oder der Zufügung chaotroper Reagenzien, etc; also geeignete Parameter, die zur Auflösung des Protein-DNA-Komplexes führen. Solche Methoden sind dem Fachmann bekannt.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform, ist das Protein oder das Polypeptid an einen Träger gekoppelt. Diese Ausführungsform stellt eine besonders einfache Möglichkeit der Anreicherung prokaryontischer DNA bereit, da die Separation aus der Lösung besonders einfach, beispielsweise physikalischer Entfernung (z.B. Abzentrifugation) des oder der beladenen Träger aus der Lösung erfolgt.

Als Lösung der prokaryontischen DNA kommt grundsätzlich jedes geeignete Lösungsmittel in Frage. Besonders zweckmäßig ist das Verfahren jedoch zur Anreicherung prokaryontischer DNA aus Lösungen, die verschiedene biomolekulare Spezies, insbesondere verschieden Arten von DNA enthalten. Die Erfindung betrifft vorzugsweise ein Verfahren zur Trennung und Anreicherung prokaryontischer oder viraler DNA und eukaryontischer DNA aus einem Gemisch von prokaryontischer oder viraler DNA. Dabei wird beispielsweise die in Körperflüssigkeiten befindliche prokaryontische DNA durch spezifische Bindung an das Protein oder das Polypeptid von der eukaryontischen DNA getrennt und angereichert. Die so angereicherte prokaryontische DNA erleichtert den Nachweis prokaryontischer Erreger mit Hilfe molekularbiologischer Methoden und kann zur Diagnose von Krankheiten die durch pathogene Erreger verursacht werden, beitragen.

Insbesondere die Ausführungsform, bei der das DNA-bindende Protein oder Polypeptid an die Oberfläche eines Trägers immobilisiert ist, eignet sich für eine Adsorption prokaryontischer DNA aus Körperflüssigkeiten, vorzugsweise aus dem Blut. Dieser Ansatz bietet überdies die Möglichkeit, mikrobielle DNA, die im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten vorliegt, aus diesen zu entfernen. Die so von der mikrobiellen DNA, die auch allein in der Lage ist, schwere Entzündungsreaktionen bei Patienten auszulösen, gereinigte Körperflüssigkeit (z. B. Vollblut, Serum oder Liquor), kann dann in den Körper zurückgeführt werden.

Als Körperflüssigkeiten im Sinne der Erfindung werden alle vom Körper eines Säugers, einschließlich Mensch, stammenden Flüssigkeiten verstanden, in denen Krankheitserreger vorkommen können, wie z. B. Blut, Urin, Liquor, Pleural-, Perikardial-, Peritoneal- sowie Synovialflüssigkeit. Die auf humanes Blut bezogene Beschreibung der Erfindung stellt keine Einschränkung sondern nur eine beispielhafte Anwendung dar.

Als Proteine oder Polypeptide im Sinne der Erfindung werden alle eukaryontischen und prokaryontischen Proteine verstanden, die in der Lage sind, prokaryontische DNA spezifisch zu binden. Hierzu eignen sich insbesondere Proteine oder Polypeptide, die fähig sind, nicht-methylierte CpG-Motive spezifisch zu binden.

Unter bakteriellen Erregern werden vorzugsweise Erreger einer Sepsis, aber auch alle anderen bakteriellen Erreger von Infektionen verstanden. Sie können sich dabei von kommensalen Erregern unterscheiden, die gelegentlich auch in Untersuchungsproben von Patienten gefunden werden, aber keine pathogene Bedeutung haben.

Bei der Isolierung der Gesamt-DNA aus infizierten Körperflüssigkeiten kann das Verhältnis Wirts-DNA zur Erreger-DNA oft $1:10^{-6}$ bis $1:10^{-8}$ und weniger betragen. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht durch die spezifische Bindung prokaryontischer DNA an das Protein oder Polypeptid mit solchen selektiven Eigenschaften eine Anreicherung um 3 Potenzeinheiten und mehr.

Das Protein oder das Polypeptid kann dabei direkt oder indirekt an den Träger gekoppelt sein. Die Art der Kopplung hängt von dem Träger und dem Trägermaterial ab. Als Träger kommen dabei insbesondere Membranen, Mikropartikel und Harze oder ähnliche Materialien für Affinitätsmatrizes in Frage. Geeignete Materialien zur Anbindung des Proteins oder Polypeptides, sowie – abhängig von der Art des Materials – die Durchführung der Anbindung, sind dem Fachmann hinlänglich bekannt. Für die indirekte Kopplung eignen sich beispielsweise spezifische Antikörper gegen das Protein oder das Polypeptid, die ihrerseits durch bekannte Verfahren an den Träger gebunden sind.

Eine Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Anreicherung prokaryontischer DNA. Eine weitere Anwendung besteht in der Trennung von prokaryontischer DNA aus einem Gemisch eukaryontischer und prokaryontischer DNA durch die Bindung der prokaryontischen DNA an ein spezifisches Protein oder Polypeptid, welches an eine Matrix immobilisiert wurde. Das Gemisch aus körpereigner und prokaryontischer DNA wird mittels geeigneter Verfahren mit der Affinitätsmatrix in Verbindung gebracht, und dabei wird die prokaryontische DNA an das immobilisierte Protein gebunden; die eukaryontische DNA durchläuft zum Beispiel eine Trennsäule und

kann separat gesammelt werden. Affinitätsmatrizes können beispielsweise polymere Polysaccharide wie Agarosen, andere Biopolymere, synthetische Polymere, oder Träger mit Silikat-Grundgerüst wie poröse Gläser oder sonstige feste oder flexible Träger sein, an welchen das DNA-bindende Protein oder Polypeptid immobilisiert wird. Nach erfolgter Trennung prokaryontischer von eukaryontischer DNA wird die Affinitätsmatrix mit einem geeigneten Reagenz gespült, so daß entweder das Bindungsprotein mit der gekoppelten prokaryontischen DNA von der Matrix und/oder die prokaryontische DNA von dem Bindungsprotein getrennt wird und für weitere Arbeitsschritte in ausreichender Menge zur Verfügung steht.

Eine weitere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Trennung und Anreicherung prokaryontischer DNA von eukaryontischer DNA durch Bindung der prokaryontischen DNA an ein spezifisches Protein welches an Mikropartikeln immobilisiert wurde. Hierbei kommen alle Mikropartikel in Frage, die eine Immobilisierung des DNA-bindenden Proteins oder Polypeptids ermöglichen. Solche Mikropartikel können aus Latex, Kunststoff (z. B. Styropor, Polymer), Metall oder ferromagnetischen Stoffen bestehen. Weiterhin können auch fluoreszierende Mikropartikel, wie sie beispielsweise von der Firma Luminex angeboten werden, verwendet werden. Nachdem die prokaryontische DNA an die an Mikropartikel immobilisierten Proteine gebunden wurde, werden die Mikropartikel mit geeigneten Methoden, wie beispielsweise Filtration, Zentrifugation, Fällung, Sortierung über Messung der Fluoreszenzintensität oder magnetische Verfahren, von dem Stoffgemisch getrennt. Die prokaryontische DNA steht nach Trennung von den Mikropartikeln zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

Eine andere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Trennung und Anreicherung prokaryontischer DNA von eukaryontischer DNA durch Bindung der prokaryontischen DNA an ein spezifisches Protein oder Polypeptid, welches anschließend durch Elektrophorese von übrigen Bestandteilen des Gemisches getrennt wird.

Eine weitere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Trennung und Anreicherung prokaryontischer DNA von eukaryontischer DNA durch Bindung der prokaryontischen DNA an das Protein oder Polypeptid. Dieses Protein wird anschließend an entsprechende Antikörper gebunden. Die Antikörper können an feste oder flexible Substrate, z. B. Glas, Kunststoffe, Silizium, Mikropartikel, Membranen gebunden sein, oder sich in Lösung befinden. Nach Bindung der prokaryontischen DNA an das Protein oder das Polypeptid und dessen Bindung an den spezifischen Antikörper erfolgt die Trennung aus dem Stoffgemisch mit dem Fachmann vertrauten Methoden.

Als Protein oder Polypeptid eignet sich insbesondere jedes Protein oder Polypeptid, welches prokaryontische DNA beispielsweise mit nicht-methylierten CpG-Motiven bindet. Hierzu eignen sich beispielsweise spezifische Antikörper oder Antiseren gegen prokaryontische DNA. Ihre Herstellung und Gewinnung sind dem Fachmann bekannt.

Prokaryontische DNA unterscheidet sich von eukaryontischer beispielsweise durch das Vorkommen nicht-methylierter CpG-Motive. Zweckmäßigerweise ist das Protein/Polypeptid somit ein spezifisch nicht-methylierte CpG-Motive erkennendes und bindendes Protein. Dies ist zweckmäßigerweise auch ein spezifischer Antikörper oder ein entsprechendes Antiserum. Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Protein oder Polypeptid ein durch das TLR9-Gen oder durch das CGBP-Gen codiertes Protein oder Polypeptid.

Diese Ausführungsform der Erfindung basiert auf der Erkenntnis, daß sich eukaryontische DNA und prokaryontische DNA durch ihren Anteil an CpG-Motiven unterscheiden. In der prokaryontischen DNA befinden sich Cytosin-Guanosin-Dinukleotide (CpG-Motive) in einem 20-fachen Überschuß gegenüber eukaryontischer DNA. In prokaryontischer DNA sind diese Motive nicht-methyliert, wohingegen sie in eukaryontischer DNA zum größten Teil methyliert sind, was die Unterschiedlichkeit nochmals erhöht. Nicht-methylierte CpG-Motive sind nicht-methylierte Deoxycytidylat-Deoxyguanylat-Dinukleotide innerhalb des prokaryontischen Genoms oder innerhalb von Fragmenten desselben.

Zum zweiten basiert diese bevorzugte Ausführungsform der Erfindung auf der Erkenntnis, daß es Proteine oder Polypeptide gibt, die spezifisch an nicht-methylierte CpG-Motive der DNA binden. Die Bindungseigenschaft dieser Proteine/Polypeptide wird erfindungsgemäß genutzt, um prokaryontische DNA einerseits zu binden und damit andererseits aus einer Probe mit überwiegendem Anteil eukaryontischer DNA anzureichern.

Eine Anwendung zur Isolierung von cDNA, welche das Vorkommen methylierter CpG-Motive in eukaryontischer DNA nutzt, wurde von Cross et al. Nature Genetics 6 (1994) 236-244 beschrieben. Die immunstimulatorische Anwendung von einzelsträngigen Oligodesoxiribonukleotiden (ODN) mit den entsprechenden CpG-Motiven konnte mehrfach gezeigt werden (Häcker et al., Immunology 105 (2002) 245-251, US 6,239,116). Als Erkennungsmoleküle der prokaryontischen CpG-Motive wurden bisher zwei Rezeptorproteine identifiziert. Aus der WO 02/06482 ist der Toll-like-Rezeptor 9 als Erkennungsmolekül nicht-methylierter CpG-Motive bekannt. Voo et al. Molecular and

Cellular Biology (2000) 2108-2121 beschreiben ein weiteres Rezeptorprotein, das humane CpG bindende Protein (hCGBP), das in einem analytischen Ansatz als Erkennungsmolekül zum Nachweis von nicht-methylierten CpG-Motiven in prokaryontischer DNA verwendet wird. In beiden Publikationen werden die CpG-bindenden Proteine nicht zur Isolierung oder Anreicherung prokaryontischer DNA genutzt.

Besonders geeignet ist ein Protein oder Polypeptid, welches durch eine cDNA einer Sequenz mit mindestens 80 %, vorzugsweise mindestens 90 % und besonders bevorzugt mindestens 95 %, Homologie zur Sequenz gemäß der GenBank Zugangs-Nr.: NM-014593 (Version NM-014593.1, GI: 7656974; NCBI Datenbank) codiert wird. Hierbei handelt es sich um Proteine oder Polypeptide, die dem CGBP entsprechen oder davon abgeleitet sind und CpG-Motive spezifisch erkennen und binden.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das Protein oder Polypeptid durch eine cDNA einer Sequenz mit mindestens 80 %, vorzugsweise mindestens 90 % Homologie zur Sequenz gemäß der GenBank Zugangs-Nr. AB045180 (kodierende Sequenz des TLR9-Gens; NCBI Datenbank, Version AB045180.1; GI: 11761320) oder ein Fragment davon, vorzugsweise cDNA mit mindestens 80 %, besonders bevorzugt 90 %, Homologie zu Transkript Variante A (GenBank Zugangs-Nr. NM-138688; Version NM-017442.1; GI: 20302169; NCBI Datenbank) oder Transkript Variante B (GenBank Zugangs-Nr. NM-017442; Version NM-138688.1; GI: 20302170; NCBI-Datenbank) codiert.

Die Erfindung betrifft überdies ein Verfahren zur Reinigung von Körperflüssigkeiten von prokaryontischer DNA. Hierbei ist es zweckmäßig, daß die Separation extrakorporal unter sterilen Bedingungen erfolgt, damit die Körperflüssigkeiten wieder in den Körper zurückgeführt werden können, so daß das körpereigene Immunsystem bei der Beseitigung von Infektionen unterstützt wird, indem die sich in den Körperflüssigkeiten befindende prokaryontische DNA entfernt wird.

Bei der extrakorporalen Entfernung der prokaryontischen DNA aus Körperflüssigkeiten kommen alle geeigneten chemischen, mechanischen oder elektrochemischen Verfahren in Betracht. Weiterhin stellt auch die Kombination mit anderen extrakorporalen therapeutischen Verfahren, wie Hämooperation, Herz-Lungen-Maschine oder Endotoxin-Adsorber, eine weitere zweckmäßige Anwendung dar. Die Aufzählung stellt keine Begrenzung der Verfahren dar.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Detektion prokaryontischer DNA. Hierbei schließt sich nach der Anreicherung der prokaryontischen DNA ein Schritt zur Amplifikation der prokaryontischen DNA an, wozu sich alle gängigen Amplifikationsmethoden eignen (PCR, LCR; LM-PCR, etc.).

Die Erfindung betrifft darüber hinaus einen Kit zur Anreicherung prokaryontischer DNA mittels eines der vorstehend beschriebenen Verfahren, in dem zumindest das Protein/Polypeptid, vorzugsweise weitere geeignete Reagenzien zur Verfahrensdurchführung enthalten sind.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Kit neben dem Protein/Polypeptid mindestens ein Set von Primern, welche zur Amplifikation genomischer DNA bestimmter Prokaryonten unter Standardbedingungen geeignet sind.

Die Erfindung hat den Vorteil, daß durch spezifische Bindung nicht-methylierter CpG-motivreicher prokaryontischer DNA an Proteine mit spezifischer Affinität für solche Strukturen eine Konzentrierung prokaryontischer DNA aus der Gesamt-DNA eines infizierten Wirts gelingt und damit die Nachweisempfindlichkeit von Erreger-DNA in Körperflüssigkeiten stark erhöht wird.

Die Abtrennungsmöglichkeiten prokaryontischer DNA von eukaryontischer DNA mit einem spezifisch bindenden Protein sind nicht zeitaufwendiger als bekannte Methoden zur Isolierung von Gesamt-DNA. Der nachfolgende Nachweis kann aber nur über eine PCR-Reaktion erfolgen. Eine nested PCR wird in den meisten Fällen nicht notwendig sein, so daß eine beträchtliche Zeitersparnis in der Diagnostik möglich wird.

Die Erfindung soll nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert werden ohne sie darauf einzuschränken.

Abb. 1 zeigt die PCR von Streptokokken-DNA im Humanblut, und

Abb. 2 zeigt die nested-PCR mit den PCR-Produkten nach Abb.1.

Beispiel 1: Nachweisverfahren nach dem Stand der Technik.

Frisches, heparinisiertes Humanblut, das Streptococcus pyogenes mit 103/ml koloniebildende Einheiten als Erreger enthält, wird für den Erregernachweis verwendet. Die DNA wird mittels Absorption an DNA bindende Matrix mit kommerziellen Kits zur Isolierung von Gesamt-DNA aus Körperflüssigkeiten nach abgewandelter Vorschrift der

Hersteller isoliert. Dazu werden 100 µl infiziertes Blut in Eppendorf Tubes mit 200 µl des gesamten Lysispuffer, der Proteinase K und SDS enthält, versetzt. Das Gemisch wird 30 min bei 37°C inkubiert, und danach 20 min auf 95°C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 20µg Mutanolysin zugegeben und weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand auf die Zentrifugationssäulen mit DNA-bindender Matrix aufgetragen und die DNA nach Vorschrift des Herstellers gereinigt. Die gereinigte DNA wird in einem Endvolumen von 100µl 0.01 molar Trispuffer, pH 7.5 oder in gleicher Menge Elutionpuffer des Herstellers aufgenommen. Für den Erregernachweis werden Primer zur Identifizierung des Streptolysin O Gens(slo) ausgewählt.

1. PCR. Amplifikation eines 465 bp Fragmentes

Forward-Primer 1: 5'-AGCATACAAGCAAATTTTTTACACCG

Reverse-Primer 2: 5'-GTTCTGTTATTGACACCCGCAATT

Primer Konzentration 1mg/ml

Ansatz: 5 µl DNA-Isolat

0.5 µl Primer fw 1

0.5 µl Primer rv 2

14 µl Aqua dest

total 25 µl in Ready to go Kit (Amersham-Biosciences)

Reaktion:

1 x	5 min 95 °C
40 Zyklen à	30 sec. 95°C
	30 sec. 51°C
	3 min 72°C
1 x	7 min 72°C

Die Ergebnisse der PCR von Streptokokken-DNA in Humanblut sind in Abb. 1 dargestellt. Es wurden 10 µl des 25 µl Ansatzes aufgetrennt: 1) PCR Ansatz mit 5 µl Template DNA; 2) Ansatz mit 5 µl Template, 1 :10 verdünnt. 3) Positivkontrolle: 0.2 µl Streptokokken-DNA als Template ohne Anwesenheit eukaryontischer DNA aus Blut. ST) Molekulargewichtsstandard

Ergebnis: Die Primär-PCR ergibt kein sichtbares PCR-Produkt. Deshalb wurde nachfolgend eine 2. PCR (nested PCR) durchgeführt.

2. PCR (nested): Amplifikation eines innerhalb des obigen slo-Fragmentes 348 bp Fragmentes

Forward Primer 3: 5'- CCTTCCTAATAATCCTGCGGATGT-3'

Reverse Primer 4: 5'- CTGAAGGTAGCATTAG TCTTTGATAACG-3'

Primer-Konzentration: 1mg/ml

Ansatz: 5 µl aus PCR1, Probe 1, Abb. 1
0.5 µl Primer fw 1
0.5 µl Primer rv 2
14 µl Aqua dest
total 25 µl in Ready to go Kit (Amersham-Biosciences)

Reaktion:

1 x	5 min 95°C
50 Zyklen à	30 sec. 95°C
	30 sec. 54°C
	3 min 72°C
1 x	7 min 72°C

Abb. 2 zeigt die Nested PCR mit den PCR-Produkten aus dem 1. PCR-Ansatz nach Abb. 1 als Template. Die Proben entsprechen denen aus Abb. 1.

Ergebnis: In der nested PCR wird das gewünschte slo-DNA Fragment amplifiziert bei einer Erregerzahl von 100 Streptokokkenzellen pro 100 µl Blut (Probe 1). Das entspricht bei 5 µl Template DNA in der 1. PCR (Abb. 1) ca. 5 bis 10 Template-Molekülen. Bei einer 1 : 10 Verdünnung (Probe 2) ist die Empfindlichkeit erschöpft (0,5 bis 1 Template-Molekülen).

Beispiel 2: Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens

Die DNA wird aus einem Zelllysat wie oben für die bisherigen PCR-Verfahren beschrieben in Lösung gebracht. Der Unterschied ist, daß zwischen 1 ml und 5 ml Untersuchungsmaterial eingesetzt werden.

Drei Milliliter frisches, heparinisiertes oder Citrat-versetztes Humanblut, das *Streptococcus pyogenes* mit 102/ml koloniebildende Einheiten als Erreger enthält wird für den Erregernachweis verwendet. Die DNA wird mit Lysepuffern, die SDS und Proteinase K enthalten, aus kommerziellen Kits zur Isolierung von Gesamt-DNA aus Körperflüssigkeiten nach abgewandelter Vorschrift der Hersteller isoliert. Dazu werden 3 ml infiziertes Blut mit 6 ml des gesamten Lysispuffer, der Proteinase K und SDS enthält, versetzt. Das Gemisch wird 30 min bei 37°C inkubiert, und danach 20 min auf 95°C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 200 µg Mutanolysin zugegeben und weitere 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wird das Gemisch mit Ethanol bei einer

Endkonzentration von 70 % gefällt und nach Zentrifugation wird das Pellet mit 2 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Der Ethanolrest wird in einer Vakuumzentrifuge entfernt und die gefällte DNA in 500 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA wird dann auf eine Säule, die 0.5 ml Sepharose enthält und an die 1 mg TLR9 immobilisiert ist, aufgebracht. Die Säule wird mit 5 Volumen TE-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgt mit chaotropen Ionen in hoher Konzentration, z. B. mit 0,7 ml 6 molarer NaJ oder KSCN Lösung. Dieses Eluat kann dann direkt auf eine kommerzielle DNA-Isolierungszentrifugationssäule aufgetragen werden und die CpG-angereicherte DNA nach Vorschrift, wie im Eingangsbeispiel, auf ein kleines Volumen zwischen 20 µl und 100µl isoliert und zur weiteren Analyse, wie Erreger-PCR, eingesetzt werden.

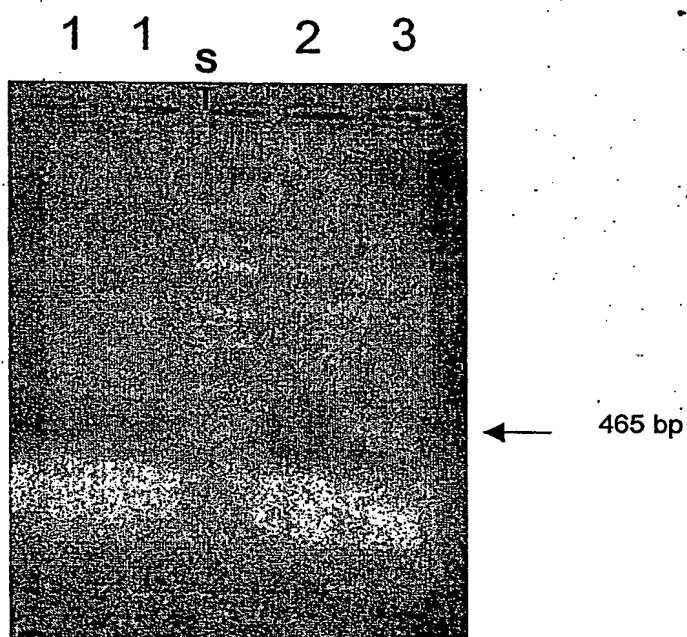
Patentansprüche

1. Verfahren zur Anreicherung prokaryontischer DNA mit den Schritten:
 - a) Kontaktierung mindestens einer in Lösung befindlichen prokaryontischen DNA mit mindestens einem Protein oder Polypeptid, das fähig ist, spezifisch an die prokaryontische DNA zu binden, wodurch ein Protein- oder Polypeptid-DNA-Komplex gebildet wird, und
 - b) Separation des Komplexes.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei sich an die Separation ein Schritt zur Trennung von DNA und Protein oder Polypeptid anschließt.
3. Verfahren gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Protein oder das Polypeptid an einen Träger gekoppelt ist.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei das Protein oder das Polypeptid direkt an den Träger gekoppelt ist.
5. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei das Protein oder das Polypeptid über einen dagegen gerichteten Antikörper an den Träger gekoppelt ist.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5, wobei der Träger als Matrix, Mikropartikel oder Membran ausgebildet ist.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Separation mittels eines gegen das Protein oder das Polypeptid gerichteten Antikörpers oder Antiserums erfolgt.
8. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Separation mittels Elektrophorese erfolgt.

9. Verfahren gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Protein oder das Polypeptid ein gegen nicht-methylierte CpG-Motive gerichteter Antikörper oder ein entsprechendes Antiserum ist.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Protein oder das Polypeptid durch das TLR9-Gen oder durch das CGBP-Gen codiert wird.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10, wobei das Protein oder das Polypeptid durch eine cDNA einer Sequenz mit mindestens 80 %, vorzugsweise mindestens 90 %, Homologie zur Sequenz gemäß der GenBank Zugangs-Nr. XM-165661 codiert wird.
12. Verfahren gemäß Anspruch 10, wobei das Protein oder das Polypeptid durch eine cDNA einer Sequenz mit mindestens 80 %, vorzugsweise mindestens 90 %, Homologie zur Sequenz gemäß der GenBank Zugangs-Nr. AB045180 oder einem Fragment davon, vorzugsweise einer cDNA mit mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 %, Homologie zu Transkript Variante A (GenBank Zugangs-Nr. NM-138688) oder Transkript Variante B (GenBank Zugangs-Nr. NM-017442) codiert wird.
13. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Lösung ein Gemisch aus eukaryontischer und prokaryontischer DNA enthält.
14. Verfahren gemäß Anspruch 13, wobei die Lösung eine Körperflüssigkeit ist.
15. Verfahren zur Reinigung von Körperflüssigkeiten von prokaryontischer DNA gemäß Anspruch 14, wobei die Separation extrakorporal unter sterilen Bedingungen erfolgt.
16. Verfahren zur Detektion prokaryontischer DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei sich ein Schritt zur Amplifikation der prokaryontischen DNA anschließt.
17. Kit zur Anreicherung prokaryontischer DNA mittels eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14.
18. Test Kit zur Detektion prokaryontischer DNA mittels eines Verfahrens nach Anspruch 16 mit einem oder mehreren Sets spezifischer Primer.

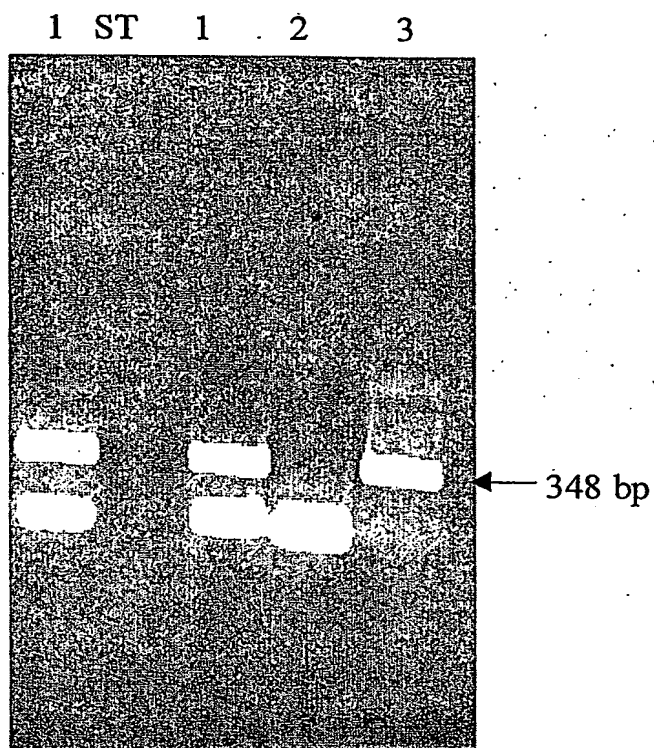
1/2

Abb. 1



2/2

Abb. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/08825

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CROSS S H ET AL: "PURIFICATION OF CPG ISLANDS USING A METHYLATED DNA BINDING COLUMN" NATURE GENETICS, NEW YORK, NY, US, vol. 6, no. 3, 1 March 1994 (1994-03-01), pages 236-244, XP000578157 ISSN: 1061-4036 cited in the application page 236, right-hand column, paragraph 2 -page 237, right-hand column, paragraph 1; figure 2B --- -/--	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 February 2004

Date of mailing of the international search report

17/02/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmitz, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/08825

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CARLONE D L ET AL: "Cloning and characterization of the gene encoding the mouse homologue of CpG binding protein" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 295, no. 1, 24 July 2002 (2002-07-24), pages 71-77, XP004381373 ISSN: 0378-1119 the whole document</p>	
A	<p>HEMMI HIROAKI ET AL: "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 408, no. 6813, 7 December 2000 (2000-12-07), pages 740-745, XP002168474 ISSN: 0028-0836 the whole document</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/08825

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/10		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, PAJ, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CROSS S H ET AL: "PURIFICATION OF CPG ISLANDS USING A METHYLATED DNA BINDING COLUMN" NATURE GENETICS, NEW YORK, NY, US, Bd. 6, Nr. 3, 1. März 1994 (1994-03-01), Seiten 236-244, XP000578157 ISSN: 1061-4036 in der Anmeldung erwähnt Seite 236, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 237, rechte Spalte, Absatz 1; Abbildung 2B --- -/--	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *G* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 9. Februar 2004		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 17/02/2004
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Schmitz, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CARLONE D L ET AL: "Cloning and characterization of the gene encoding the mouse homologue of CpG binding protein" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, Bd. 295, Nr. 1, 24. Juli 2002 (2002-07-24), Seiten 71-77, XP004381373 ISSN: 0378-1119 das ganze Dokument	
A	HEMMI HIROAKI ET AL: "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD: LONDON, GB, Bd. 408, Nr. 6813, 7. Dezember 2000 (2000-12-07), Seiten 740-745, XP002168474 ISSN: 0028-0836 das ganze Dokument	